

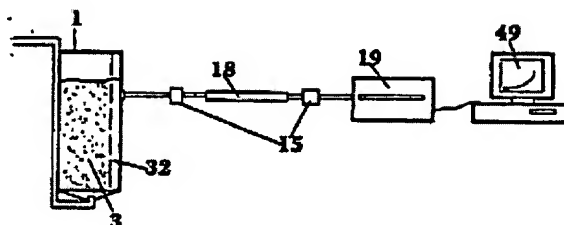
Quantitive and qualitative method detects microorganisms

Patent number: DE19605753
Publication date: 1997-09-04
Inventor: PAUTZ NORBERT (DE)
Applicant: PAUTZ NORBERT (DE)
Classification:
- **International:** C12Q1/02; C12M1/04; C12M1/36
- **European:** C12M1/34; C12Q1/04
Application number: DE19961005753 19960216
Priority number(s): DE19961005753 19960216

[Report a data error here](#)

Abstract of DE19605753

Method and apparatus for quantitatively and qualitatively detecting, within minutes, the presence of microorganisms in sub- ppb concentrations, in aerobic and anaerobic conditions, or in the transitional state of mesophilic, psychotropic or thermophilic bacteria, where the novelty is that in a reaction vessel (1), a test sample is provided with the optimum growth conditions, controlled temperature and buffered nutrient, for a particular or general bacteria; the metabolic products are collected separately from the bacteria and nutrient; and are accumulated before analysis.



Data supplied from the **esp@cenet** database - Worldwide



⑬ BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENTAMT

⑫ **Offenlegungsschrift**
⑩ **DE 196 05 753 A 1**

⑤ Int. Cl.⁸:
C 12 Q 1/02
C 12 M 1/04
C 12 M 1/36

⑲ Aktenzeichen: 196 05 753.1
⑳ Anmeldetag: 16. 2. 96
㉑ Offenlegungstag: 4. 9. 97

DE 196 05 753 A 1

⑦ Anmelder:
Pautz, Norbert, 79540 Lörrach, DE

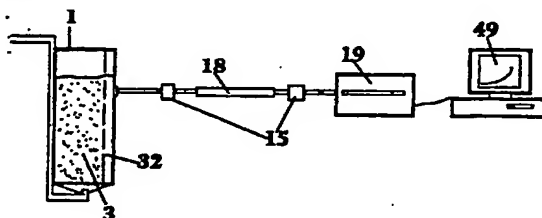
⑧ Erfinder:
gleich Anmelder

⑥ Entgegenhaltungen:
US 52 17 875
US 52 17 848
Nelson W.H., Modern techniques for rapid
microbio-logical analysis, VCH Verlagsgesellschaft
mbH, Weinheim 1991, S.19-42;
Owens J.D., J. General Microbiology 131
(1985) 3055-3076;

Prüfungsantrag gem. § 44 PatG ist gestellt

⑤ Verfahren und Vorrichtung zur Detektion von stoffwechselaktiven, unlädierten, ungestressten Mikroorganismen - quantitativ und qualitativ im »Sub-ppb-Bereich« innerhalb von Minuten

⑤ Das Verfahren und die Vorrichtung dient zur schnellen Detektion von stoffwechselaktiven, unlädierten, ungestreßten Mikroorganismen - quantitativ und qualitativ im "Sub-ppb-Bereich" innerhalb von kürzester Zeit in der Regel nur Minuten und keine Stunden - im "ON-LINE-Betrieb" als quasi "Real-Time-Methode".
Stoffwechsel-Zwischen- bzw. End-Produkte von Mikroorganismen in einer unter bestimmten Bedingungen optimierten "Kultur" (3) in einer speziellen "Gas-Reaktor-Zelle" (1) werden während des Wachstums von der Matrix (Medium) getrennt und einer Hochanreicherung zugeführt. Diese Hochanreicherung ist variabel und kann im Extremfall beliebig oft wiederholt werden.
Aufgrund chemisch, physikalischer Mechanismen wird diese Hochanreicherung durchgeführt und mit gleicher "Massenfluß-Technik" den speziellen Detektorenanordnungen zugeführt.



DE 196 05 753 A 1

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Messung des Keimgehaltes über die freigesetzten Stoffwechsel-Zwischen- und Endprodukte in einer speziellen Medium-Kultur unter Anwendung eines störungsfreien, optimierten Wachstumsprozesses in einer besonders konstruierten "Gaszelle" als "Reaktor". Sie isoliert während dieses Prozesses Medium von Bakterien und führt die sehr unterschiedlichen Stoffwechselprodukte einer chemisch, physikalischen Trennung und Hochanreicherung zu. Die neuen, apparativen Konstruktionsmerkmale bilden eine Einheit. Sie sind nicht voneinander trennbar, da sonst das System nicht funktioniert.

Das erfindungsgemäße Verfahren findet seinen Einsatz in der Mikrobiologie. Es findet dort Einsatz, wo sehr schnelle Ergebnisse in unteren Keimbereichen von etwa 0 bis 100 bzw. 1000 KBE/ml bzw. g, gefordert werden. Die Hauptanwendung ist als analytisches Verfahren zur schnellen Detektion von Mikroorganismen in kritischen Bereichen konzipiert. Sie weicht vollständig ab von den bekannten Konzepten des Standes der Technik — egal welche Beispiele genannt werden — da keine (wie üblich) Voranreicherung (selektiv/nichtselektiv) stattfindet.

Sie ist vergleichbar mit der Idee der "pcr-Technik" die eine "Multiplifier-Funktion" als Reaktionsschritt eines Teils der Zelle (DNA) zur Hilfe nimmt. Sie überwindet aber jegliche Art und Nachteile von "Transfer-Schritte". Alle bekannten Techniken zeigen nicht die vorgeschlagene Vorgehensweise — sondern praktizieren eher das Gegenteil. Die konstruktive erste Stufe der vorgeschlagenen "Gas-Zelle" als Reaktor steht im konstruktiven Gegensatz des klassischen Perkulationsapparates (Zuleitung von Nährstoffen) oder bekannten aeroben Fermentern, da in der vorgeschlagenen Methodik eine Abführung von Medium zeitlich erfolgt, die eine Konzentrationserhöhung von Bakterien in der Kultur zur Folge hat, wobei aber zeitgleich Bakterien vom Medium getrennt werden. Es ist kein Verfahren bekannt, das in einer statischen Kultur unter den optimierten Bedingungen so verfährt, da es im Gegensatz zur Lehrmeinung steht.

In einem Kulturmedium laufen zeitgleich verschiedene Reaktionen, je nach Zusammensetzung des Mediums, Anteil an:

Sauerstoff, Temperatur, pH-Wert, Ionenkonzentration von anorganischen Verbindungen, organische Polymere bzw. monomere Verbindungen, Kohlenstoff-, Stickstoff-Quelle, Ladungszustände von Verbindungen und Molekülen als Elektron-Donator oder Elektron-Akzeptor (Redox-Gleichgewichte), anorganische Ionenkonzentration, metabolische Zwischen- oder Endprodukte sowie H^+ -Ionenkonzentration des Systems als auch der Pk_a -Wert der Puffersysteme (Journal of General Microbiology (1985), 131, 3055-3076, J.D.Owens) ab.

Besondere Aufmerksamkeit verdient auch die Konzentration an CO_2 in einem Medium, da bei geeignetem Puffersystem (pH-Wert) dieses als HCO_3^- vorliegt, da sehr oft große Mengen an Kohlendioxyd als Primär-Reaktion durch Mikroorganismen gebildet werden.

Verändert man die Atmosphäre eines Mediums um streng anaerobe Bedingungen einzuhalten, kann man beispielsweise flüchtige Fettsäuren mittels Gaschromatographie — als Fingerprinting — detektieren (Virginia Polytechnic Institute and State University Anaerobe Laboratory Blacksburg, Virginia 1972).

Um es vereinfacht darzustellen kann man folgende

grobe Aussage verallgemeinern:

Polymere Verbindungen — d. h. Makromoleküle werden abgebaut zu monomeren Verbindungen, beispielsweise Proteine von Bakterien umgesetzt zu Aminosäuren, die wenn frühzeitig detektiert zur qualitativen und oder quantitativen Bestimmung herangezogen werden können. Zucker werden von Hefen abgebaut zu kurzkettigen Peptiden oder beispielsweise Lipide von Schimmelpilzen zu kurzkettigen organischen Säuren usw. Die Zahl der Publikationen ist endlos.

Viele heute (Stand der Technik) bekannte Methoden messen mit entsprechender Technik (Beispiel: Leitfähigkeitstechnik) direkt im Nährmedium und erreichen dabei eben nur eine Konzentrationsschwelle von etwa 106 Keimen 1 ml, d. h. sie benötigen zur Detektion von einem aktiven Mikroorganismus ca. 24 Stunden bei nicht selektivem Medium (Gesamtflora bzw. Gesamtkeimzahl aerober, mesophiler Keime).

Das gleiche zeitliche Problem wird nicht gelöst bei allen anderen, heute praktizierten Methoden (soweit sie überhaupt quantitative Ergebnisse liefern können) wie: Biolumineszenz- ATP, ELISA, Flow Cytometry, DNA-Probes (hybridisation), ELFA, PCR u.v.a.m.

Der Level des Schwellenwertes ist unterschiedlich — aber keine beschriebene Methode erreicht Werte unter 1000 Keime / ml in "real time". Jede Methode greift zurück auf Voranreicherungsschritte etc. Keine der oben genannten Methoden ist "ON-LINE"fähig oder läuft als Gesamtsystem für alle Keime automatisch "real time".

Davon ausgehend liegt der Erfindung die Aufgabe zugrunde, ein schnell und sicher arbeitendes Verfahren mit einer entsprechenden Vorrichtung zu schaffen, das kontinuierlich bzw. semikontinuierlich arbeitet, in einem geschlossenen System. Das in der Lage ist in kürzesten Zeiten (Minuten) Ergebnisse (KBE/ml) zu liefern aber "Transfer-Schritte" vermeidet. Das im geschlossenen System als Anfangs- bzw. Ausgangsbedingung, Sterilität gewährleistet und "ON-LINE" automatisch abläuft sowie als "quasi" "Real-Time-Methode" besteht.

Als technische Lösung wird mit der Erfindung verfahrensmäßig vorgeschlagen ein optimiertes Wachstum unter ganz speziellen Kriterien durchzuführen, wobei Gasströmung zur Schaffung von aeroben oder anaeroben Bedingungen oder deren Zwischenzustände herbeigeführt wird. Alle bekannten Gase sind zulässig — oder deren beliebige Mischung. Das Ziel dieses Schrittes ist es, mit einer definierten, gewählten Temperatur für spezielle Mikroorganismen optimale Wachstumsbedingung zu schaffen, um zeitgleich Medium von Mikroorganismen zu trennen, Stoffwechselprodukte von Mikroorganismen einer Hochanreicherung zuzuführen.

Wichtig für die Detektion von aktiven Mikroorganismen — die über die Stoffwechselaktivität frühzeitig detektiert werden sollen — sind folgende Kriterien:

Optimale Bedingungen des Wachstums durch:

- I. Bereitstellung eines optimalen Nährstoffangebotes (N -, C -Quelle) und vielfach überhöhte Substratkonzentration
- II. optimaler Temperaturbereich — Inkubationstemperatur
- III. Aerobe- bzw. anaerobe Atmosphäre oder deren Übergangszustände — auch als Löslichkeit im Nährmedium
- IV. optimaler pH-Wert (Puffersystem) und homogene Verteilung.

Da auch ein einzelner nachzuweisender Mikroorganismus aktiv im Stoffwechsel sein muß, wenden alle bisher bekannten Verfahren einen ersten Schritt an, um eine Anzahl von z. B. Bakterien mengenmäßig auf einen Level zu bringen, um mit einer nachgeschalteten Methode, diese auf sehr unterschiedliche Weise, zu erfassen.

Dieser erste Schritt muß aber schon optimiert werden in bezug auf Wachstumsgeschwindigkeit. Das ist ein bisheriger Nachteil bestehender Verfahren, die nicht konsequent genug dieses umsetzen, z. B. im mikrobiologischen Analysengerät. Dieses führt zu einer neuentwickelten Wachstumszelle als Reaktor der diese Bedingungen herstellt, und im mikrobiologischen Analysator eingesetzt wird.

Will man Mikroorganismen (heute) qualitativ nachweisen, genügen bekannte Verfahren der Voranreicherung. Dieses wird in der Regel für pathogene Keime durchgeführt. Aber auch andere Verfahren führen Voranreicherungen durch um im Nachhinein mit klassischen Methoden "Koloniebildende Einheiten" pro Volumen oder Gewicht zu erfassen.

Nachteil dieser Verfahren sind in der Regel Transfer-Schritte, wo Mikroorganismen gestreßt, lädiert werden und ein in Gang gesetzter Stoffwechselschritt unterbrochen wird. Die Folge ist ein Verzögerung des Wachstums als nicht optimale Bedingung. Dieses gilt es zu vermeiden. Auch ist ein Voranreicherungsschritt mit dem Nachteil behaftet, daß eine Kalibrierung mit Hilfe des klassischen Plattengußverfahrens verfälscht wird!

Betrachtet man einen einzelnen Mikroorganismus und beispielsweise eine Reaktion, wo Enzyme, polymere Verbindungen spalten zu monomeren Verbindungen, kann durch diesen Sachverhalt wenn er durch genügend vorhandene Biomasse gedeckt wird, auf sogenannte "Primär-Reaktionen" geschlossen werden. Hierbei sind die chemischen und physikalischen Eigenschaften der neu entstandenen Verbindungen entscheidend, z. B. Beispiel — eine Aminosäure.

Es muß also durch entsprechende Kulturbedingungen eine Reaktion gefördert werden die entsprechende Reaktionsprodukte liefert in genügend hoher Konzentration um eine Bestimmung durchzuführen, da die Generationszeit eines Mikroorganismusses nicht beliebig reduziert werden kann.

Dieses ist der genaue Ansatzpunkt des neuen, vorgeschlagenen Verfahrens und entsprechender Vorrichtung.

A. Es wird eine optimale Kulturbedingung hergestellt

B. Die nach kurzer Zeit entstandenen Reaktionsprodukte werden aufkonzentriert um so eine Detektion nach kürzester Zeit durchführen zu können, die durchaus kürzer sein kann als eine Generationszeit eines Mikroorganismusses, da die Reaktionsprodukte in Summe schon so hoch sind, daß vor einer ersten kompletten Zellteilung eine Bestimmung durchgeführt werden könnte.

Allein durch diese Vorgehensweise: a. optimale Kulturbedingung gleich höchste Ausbeute pro Zeiteinheit und b. Aufkonzentration der Reaktionsprodukte zu einem Level der eine Messung im sub-ppb-Bereich ermöglicht, da eben keine Mikroorganismen aufkonzentriert (vorangereichert) werden, sondern die aus ihnen entstandenen Stoffwechsel-Reaktionsprodukte.

Da das Verfahren in vitro abläuft, also ein wäßriges

Medium vorherrscht, werden geeignete Mechanismen und Techniken eingesetzt die einen "On-Line" Betrieb des Gesamtsystems (Fig. 1) ermöglichen. Da es sich in der Regel um lösliche, teilweise dissoziierte Verbindungen (Moleküle) oder anorganische, ionische Verbindungen handelt, werden diese an Ionen-Austauschern aufkonzentriert (Säulenschaltung), um mit einem geeigneten Eluens als scharfe Bande (Peak — Gaussche Verteilungskurve) eluiert zu werden, um dann je nach Stoffklasse und chemischer Konfiguration (funktionelle Gruppen) chemisch modifiziert (Reaktion, z. B. Aminosäuren mit o-Diphtalaldehyd oder Ninhydrin etc.) einer Bestimmung zugänglich gemacht zu werden, in Form von z. B. fluoreszierenden Verbindungen die im Fluoreszenzdetektor, detektiert zu werden.

Es wurden Applikationen gefahren, die über diesen "Aufkonzentrierungsschritt" mühelos den "ppt-Level" erreichten. Das bedeutet konkret, daß die von einem Mikroorganismus freigesetzte Menge an löslichen Stoffen, die z. B. die Leitfähigkeit verändern ausreicht, um einen Nachweis, zu führen.

Eine andere Variante wäre die Ionenkonzentration im Gesamtsystem der wäßrigen Matrix da bei Wachstum von Mikroorganismen eine Zunahme oder Abnahme von Ionenspezies registriert werden können. Durch ein geeignetes Säulenmaterial (Ionenaustauscher) wird wiederum aufkonzentriert, durch eine Säulenschaltung (Fig. 2) wird eluiert und die Konzentrationsbande im geeigneten Detektionssystem (Fig. 3) — Leitfähigkeitsdetektor bestimmt als Konzentrations-Peak. Dieses läßt sich je nach Stoffklasse beliebig modifizieren um verschiedenste Nachweistechiken, zu adaptieren.

Folgende Kriterien werden zur Optimierung herangezogen und sind durch die konstruktiven Merkmale der Vorrichtung möglich geworden:

a. Steuerbare (Gasfluß) Zufuhr von Luft oder Gas-mischungen beliebiger Zusammensetzung die vortemperiert sein können aber in jedem Falle von Mikroorganismen 100%-ig befreit sind, durch entsprechende Techniken.

aa. Eine (Vor-)Gaskühlung ist ebenso vorzusehen um im Bedarfsfall Temperatur-Gradienten zu fahren.

aaa. Auch eine Intervallschaltung des Gasflusses (Pulsen) ist vorgesehen.

b. Ein konstanter Partialdruck und somit eine bestimmte Löslichkeit von z. B. Sauerstoff wird durch die konstruktive Maßnahme — eines Strömungswiderstandes (Filter) — siehe Fig. 1/Teil 11, umgesetzt. Er dient gleichzeitig zur Wasserabscheidung.

c. Durch konstruktive Parameter der Bodenfritte gelingt es Turbulenz zu erzeugen, die einen nötigen Rühreffekt bewirkt. Das bewirkt eine Verhinderung von Klumpenbildung (keine Mikrostandorte). Zugleich dient es einem homogenen Nährstoffangebot pro Zeit (Substratkonzentration).

d. Der "Gaszellen-Reaktor" weist zwei Strömungsausgänge auf (Fig. 1/13). Diese Ausgänge dienen zur zeitlichen Austragung von Medium und verhindern durch eine "Membranfritte" (0,4µ bis 0,2µ):

a. den Abtransport von Bakterien

b. das Einströmen von Gasblasen in die Leitungen.

e. Das Mehrwegeventil (15) ist in der Schaltung zur Pumpenseite offen ebenso zur Zelle (Membranfilter) und hat im jetzigen Strömungsbereich auch die Kartusche (16) bzw. Säulenseite geöffnet um im PC kontrollierten Mode z. B. 100µl Medium, zu

fördern. Nach definierter Steuerungszeit schließt das Ventil (15) wieder und hat unter Berücksichtigung des Totvolumens von Leitung und Säule unter ggf. zur Hilfenahme eines Eluenten (z. B. wäßrige Lösung) das Aufgabevolumen von 100 µl auf einen Ionenaustauscher aufkonzentriert.

f. Durch Wechseln des Eluenten (Ventilumschaltung) wird nun in Richtung Magnetventil (Mehrport) (17) eluiert, um mit entsprechenden Eluenten von der Säule eine schmale Konzentrationsbande des angereicherten Stoffes (Ionen, Carbonsäuren, Aminosäuren usw.), zu eluieren. Eine nachgeschaltete Säule bzw. Kartusche kann diesen Vorgang wiederholen:

f1. und kann entweder durch eine völlig andere stationäre Phase aus diesem angereicherten Eluenten eine andere Stoffklasse abtrennen

f2. oder durch Öffnen des Mehrportventiles (17) ein Reagens wie z. B. o-Diphthalaldehyd in entsprechender Menge und Konzentration unter Einsatz einer Temperatur-Coils zur Reaktion bringen um ein fluoreszenzfähiges Derivat zu erhalten, führt aber im Normalfall nach erster "Hochanreicherung" die aufkonzentrierte "Stoffmenge" im Eluenten einem Detektor zu. Im einfachsten Fall ist dieses ein High-Performance-Leitfähigkeitsdetektor, der durch Vergleichsmessung der Referenzzelle und Probenmeßzelle (Fig. 3) ein analoges Signal zur Änderung der Leitfähigkeit registriert.

Durch geeignete Software ähnlich die der Chromatographie (Integrator) erhält man eine Fläche unter der Kurve, die proportional einer Konzentration der Ionen ist, bzw. bei anderen Detektoren die der isolierten Stoffklasse.

Eine Weiterbildung des erfindungsgemäßen Verfahrens schlägt vor, daß für indirekte Messungen bzw. Methoden beispielsweise Hefen oder Schimmel in einem selektiven optimierten Kulturmedium gezüchtet werden um gasförmige Reaktionsprodukte wie hier CO₂ nachzuweisen.

Zur Optimierung innerhalb der Gas-Reaktor-Zelle (1) wird durch das Septum-Port (2) ein Enzym zur Reaktionsbeschleunigung zugesetzt (z. B.: Kohlensäure-Dehydratase). Da Enzyme nur in bestimmten pH-Bereichen arbeiten wird dieser Port auch zur automatischen Abpufferung des Nährstoffmediums eingesetzt.

Man leitet dann einfach das quantitativ erzeugte Kohlendioxyd in eine Lauge z. B. 0,1 molare KOH und mißt die Abnahme der OH⁻-Ionenkonzentration zur Referenz-Zelle. Ein geeigneter Ionenaustauscher wird vorgeschaltet und wiederum die aufkonzentrierten Ionen-Spezies nachgewiesen.

Andere Reagenzien sind einsetzbar z. B. als NH₃-Nachweis 0,1m Schwefelsäure oder für Schwefelwasserstoffnachweis lösliche Kupfer-, Blei- oder Quecksilber-Salze usw.

Eine Weiterbildung schlägt vor, daß alle Messungen über eine rechnergestützte Verfahrensweise gesteuert und ausgewertet werden, da man mit diesen neuen Techniken in Detektionsbereiche vordringt, die ohnehin vorher nicht erreicht wurden. Wichtig ist, daß alle Ionenaustauscher Kationen- oder Anionen-Austauscher eingesetzt werden können, sowie alle z. B. in der Flüssigkeitschromatographie bestens bekannten Trägermaterialien und Eluenten, die alle Bereiche dieser Technik umfaßt.

Da der Zeitbedarf für den Aufkonzentrierungsschritt

nur wenige Minuten benötigt, ist es wichtig die Generationszeit der Mikroorganismen zu berücksichtigen, da es natürlich MO's gibt, die einen sehr inaktiven Stoffwechsel bzw. langsamen vorweisen. Hier genügt es die erste automatische Probennahme (z. B. 50 oder 100 µl) erst nach 30 Minuten erfolgen zu lassen und nicht wie beispielsweise für koliforme Keime nach 12 bzw. 15 Minuten.

Da Konzentrationen im Massenfluß bestimmt werden, können diese "Aufgabemengen" variiert und günstig beeinflusst werden. Das gilt genauso für den Aufkonzentrierungsschritt und das Elutionsvolumen und die Elutionsgeschwindigkeit auf einer stationären Phase.

Eine Weiterbildung des erfindungsgemäßen Verfahrens schlägt die quantitative Erfassung mit bekannten Algorithmen ähnlich der Chromatographie vor, wo eine Fläche unter der Kurve einer bestimmten Konzentration entspricht. Berechnungen über internen oder externen Standard sind möglich. Die Zunahme der beispielsweise Ionenkonzentration in einer bestimmten Zeit, z. B. 15 Minuten kann durch drei Messungen — sprich 3 Peakhöhen — dargestellt werden. Verbindet man diese Höhen (Scheitelpunkt der Kurve des einzelnen Peaks) miteinander entsteht eine Kurve (typische exponentielle Funktion) die dem Wachstumsvorgang (Wachstumskurve) entspricht.

Der Vergleich mit der traditionellen Methode (Ausstreichen auf Agarplatten/MPN-Verfahren) gewonnenen Werte (KBE/g bzw. ml) ermöglicht die quantitative Bestimmung im Rechner. Eine logarithmische Darstellung der Kalibrierung ist so möglich und durch lineare Regressionsberechnung der Variationskoeffizient darstellbar.

Eine weitere Weiterbildung des Verfahrens sieht eine erweiterte Vorrichtung vor, ausgehend von der Gas-Reaktor-Zelle (1), die eine im Durchmesser kleinere aber aber etwas höhere Gas-Reaktions-Mischzelle (Fig. 4/32) vorweist, die mit Lauge (z. B. KOH) oder anderen Reagenzien befüllt ist (PbAc, HgCl₂ usw.).

Hier werden durch "Primär-Reaktion" der von den Mikroorganismen erzeugten, gasförmigen Stoffwechselprodukte wie beispielsweise CO₂, H₂S, NH₃ usw. chemisch zur Reaktion gebracht und wie beschrieben umgekehrt, als z. B. Abnahme der OH⁻-Konzentration registriert. Je nach Ionen-Spezies und Auswahl des Ionenaustauschers können hier Nachweise geschehen im Massenfluß-Leitfähigkeits-Detektor.

Ein Ausführungsbeispiel einer erfindungsgemäßen Vorrichtung zur "Erfassung" von Keimen wird nachfolgend anhand der Zeichnungen beschrieben. In diesen zeigt:

Fig. 1 Ansicht einer Gaszellen-Reaktors zur Erfassung nicht gasförmiger aus dem Stoffwechselprodukt von Mikroorganismen stammender Zwischen- bzw. End-Reaktionsprodukte, mit zwei Bypass-Leitungen inklusive Filtern, Mehrwegventilen, Säulen und Tandemdetektor.

Fig. 2 Eine Säulenschaltung mit verschiedenen Säulentypen, Ventilen und Detektor.

Fig. 2/1 Einfache Konzentrier-Säulenschaltung mit einem Aufgabeventil

Fig. 3 Detailzeichnung einer Leitfähigkeits-Massenfluß-Zelle (Durchflußzelle) eines Kanales (Referenz- bzw. Meßkanal) stellvertretend für beliebige andere Lösungen.

Fig. 4 Ansicht eines Gaszellen-Reaktors für gasförmige metabolische Reaktions-Endprodukte.

Fig. 5 Aufbau einer vereinfachten Säulenschaltung als

Gesamtanlage.

Bezugszeichenliste

1 Gas-Zellen-Reaktor	5
2 Septum für Proben-Eingabe	
3 Nährmedium	
4 Gaszuführung	
5 Steigleitung (Gaszuführung)	
6 Deckel	10
7 Hahn	
8 Steg	
9 Strömungskörper	
10 Gasverteilungsraum	
11 Gasströmungswiderstand / Wasserabscheider	15
12 Gasabführungsleitung	
13 Filter / 0,2µm mit Vorfilter integriert	
14 Mediumleitung zur Konzentrations-Säule	
15 Mehr-Port-Schaltventil	
16 Vor-Konzentriersäule	20
17 Mehr-Port-Magnetventil (Derivatisierung)	
18 Trennsäule oder Konzentriersäule 2	
19 Tandem-Detektor (Mess- und Referenz-Signal)	
20 Mediumleitung für Referenzmessung	
21 Mehrportschaltventil	25
22 Mehrportschaltventil	
Zu Fig. 1	
23 Eluens-Zufuhr	
24 Eluens-Abfluß (Volumenerfassung)	
26 4-Port-Ventil 1	30
27 4-Port-Ventil 2	
28 Vorsäule	
29 Konzentriersäule	
30 Trennsäule	
31 Pumpe	35
Zu Fig. 2 (Aufgabe-Position / Injektionsventil)	
32 Reaktionskammer für gasförmige Stoffwechselprodukte	
33 Gaszuführungsleitung von 1	
34 Gasableitung von 32	40
35 Entnahme-Port für Reaktions-Lösung für Konzentriersäule	
36 Eluens-Pumpe	
Zu Fig. 4	
41 6-Port-Injektionsventil	45
42 Konzentriersäule	
43 Probenpumpe	
44 Probenbehälter (Gas-Zellen-Reaktor)	
45 Abfluß	
46 Leitung zur Trennsäule	50
47 Eluenten-Pumpe	
48 Controller (Ventil, Probenpumpe) Detail A	
Umkehrung der Flußrichtung Detail B	
Zu Fig. 2/1	
49 PC mit AD-Wandler / Software zur Erfassung und Auswertung	55
Zu Fig. 5	
50 Durchfluß-Zelle zur Leitfähigkeitsmessung	
51 Eluens Einflußrichtung	
52 Eluens Ausgang	60
53 Glaskapillare mit sehr kleinem Volumen (µl-Bereich)	
54 Eingeschmolzene Elektroden	
55 Beispiel einer vorteilhaften Meßanordnung	
Zu Fig. 3	65

Patentansprüche

1. Verfahren zur Detektion von Mikroorganismen

— quantitativ und qualitativ im "Subppb-Bereich" innerhalb von Minuten unter aeroben-, anaeroben-Bedingungen oder deren Übergangszuständen von mesophilen-, psychrophilen-, bzw. thermophilen Keimen, dadurch gekennzeichnet, daß eine Atmosphäre erzeugt wird, die den optimalen Wachstumsbedingungen genau entspricht, bei der jeweiligen, optimalen Temperatur (keimspezifisch oder Gesamtflora aerob, mesophiler Keime) mit einer optimierten Nährlösung als Puffersystem in einem Gas-Zellen-Reaktor unter Isolation (Abtrennung) vom Medium (gepufferte Nährlösung) von Bakterien, um die in der Nährlösung enthaltenen Stoffwechselreaktionsprodukte einer Hochanreicherung, zuzuführen.

2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Temperatur nur auf etwa 0,1°C genau konstant sein muß als Inkubationstemperatur der Gaszelle.

3. Verfahren nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß die Luft oder ein entsprechendes Gasgemisch erwärmt und filtriert bzw. entkeimt wird, auf gleiche Inkubationstemperatur und dann durch einen Strömungskörper (Fritte) geleitet wird, wo durch aufsteigende, feine Luftbläschen (Gasbläschen) im wäßrigen Nährmedium ein Rührereffekt erzielt wird zur Vermeidung von Mikrostandorten und besserer Verteilung von Nährstoffen 1 Reaktionsprodukten im Substrat bzw. Medium.

4. Verfahren nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß Nährbouillon über einen Bypass (Rohrleitungen) nach einer bestimmten Zeit (abhängig von der Generationszeit) im Intervall aus der Gaszelle herausgeführt wird und ein bestimmtes Volumen (z. B. 100µl) als Massenfluß, zu fördern.

5. Verfahren nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß der Volumenstrom (Gas und Flüssigkeit) temperiert, konstant und reproduzierbar durchgeführt wird und in einem druckstabilen System geschieht.

6. Verfahren nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß im Bypass ein Filter von 0,4µ bis 0,2µ vorgeschaltet wird mit unterschiedlichen Materialien bestimmter Affinität zu wäßrigen Lösungen, durch der der Volumenstrom geleitet wird zur Rückhaltung von Mikroorganismen aus der Nährlösung.

7. Verfahren nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, daß der Volumenstrom der Flüssigkeit (i.d. Regel Medium) durch eine oder mehrere Säulen, Kartuschen mit spezieller Füllung geleitet wird.

8. Verfahren nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß die Füllmaterialien als stationäre Phase, wie Ionenaustauscher (Kation- u. Anionenaustauscher), Gele, Adsorptionsmaterialien, Surpressor-Membrane, Mischharze usw. die einen Ionenaustausch, Ionenausschluß, Ionen-Paarbildung und Adsorption oder Größenausschluß und deren Zwischenzustände ermöglichen, einzusetzen.

9. Verfahren nach einem der Ansprüche 1—8, dadurch gekennzeichnet, daß ein Volumen über eine "Säule" gegeben wird, die durch einen fremden, anderen Eluentenstrom gefördert bzw. befördert wird dessen Zusammensetzung andersartig ist als das Volumen, das aus der Gaszelle (Nährlösung) stammt.

10. Verfahren nach einem der Ansprüche 1—9, dadurch gekennzeichnet, daß der Volumenstrom

durch eine Pumpe (alle Arten von Pumpen) oder Druck irgendeiner Form bewerkstelligt wird.

11. Verfahren nach einem der Ansprüche 1–10, dadurch gekennzeichnet, daß Reaktionsprodukte die aus der Gaszelle (Reaktor) über den Bypass gefördert, über eine oder mehrere Säulen aufkonzentriert oder chemisch modifiziert wurden und in unterschiedlichen Detektorsystemen nachgewiesen werden (UV, Fluoreszenz, Leitfähigkeit, Amperometrie, Ionen-Sensitive-Elektroden, Lumineszenz) können.

12. Verfahren nach einem der Ansprüche 1–11, dadurch gekennzeichnet, daß Säulenschaltungen mit entsprechenden inerten, druckbeständigen Ventilsitzen zur Kombination unterschiedlicher Trenn-, Aufkonzentrier-Säulen und/oder zur Kombination unterschiedlicher Detektorsysteme herangezogen werden.

13. Verfahren nach einem der Ansprüche 1–12, dadurch gekennzeichnet, daß Temperaturkompensation des Referenzkanals und Meßkanals beliebiger Detektoren über eine PC (Computer gestützte Gesamtsteuerung mittels Software)-Lösung durchgeführt wird.

14. Verfahren nach Anspruch 13, dadurch gekennzeichnet, daß das Ausgangsmeß-Signal im Kompensation-Mode über geeignete Software mittels Algorithmus aufbereitet wird um Störsignale, Rauschen zu eliminieren und Empfindlichkeit zu steigern.

15. Verfahren nach einem der Ansprüche 1–14, dadurch gekennzeichnet, daß der Gas-Zellen-Reaktor zur Analyse von Gasen, insbesondere Luft eingesetzt wird (Continuous Air Monitoring – kontinuierliche Luftüberwachung).

16. Verfahren nach einem der Ansprüche 1–15, dadurch gekennzeichnet, daß die Gaszufuhr laminar strömend ist, durch den optimierten Strömungskörper tritt um so Mikroorganismen stressfrei ohne subletale Schädigung in die Nährlösung zu transportieren (hier: Keim-Analyse von Luft).

17. Verfahren nach einem der Ansprüche 1–16, dadurch gekennzeichnet, daß zum Befüllen des Gas-Reaktors (Fig. 4/32), zum Nachweis von stoffwechselreisetzen Gasen, wie CO_2 , NH_3 und H_2S , mit Laugen (KOH, NaOH) oder Säuren (Schwefelsäure, Essigsäure) oder Salzlösungen zur Fällungsreaktion (wie Kupferchlorid, Bleiacetat, Quecksilberchlorid) in entsprechender Konzentration in den "Neben-Gas-Reaktor" (Fig. 4/32) eingesetzt werden.

18. Verfahren nach einem der Ansprüche 1–17, dadurch gekennzeichnet, daß Reagenzien zur Derivatisierung (z. B. Ninhydrin, o-Diphthalaldehyd) mittels Ventilschaltung und Pumpe (Reagenzienpumpe) in ein thermostatisiertes Coil oder Reaktionskammer automatisch gefördert bzw. dosiert werden, um das neu entstandene Derivat (z. B. Fluoreszenz-Derivat) im geeigneten Detektorsystem nachzuweisen.

19. Verfahren nach einem der Ansprüche 1–18, dadurch gekennzeichnet, daß Volumina (Medienaustrag aus dem Reaktor), Aufkonzentriergeschwindigkeit auf eine stationäre Phase, Fördergeschwindigkeit des Eluens sowie des Reagens zur Derivatisierung automatisch, nach den Erfordernissen als Volumenstrom variiert werden können (PC-Steuerung).

20. Verfahren nach einem der Ansprüche 1–19, dadurch gekennzeichnet, daß auch ein geschlossenes Gefäß – nur mit der durch die Füllhöhe des Nährmediums freibleibenden "Headspace" (Kopfraum) gefüllten Gases unter Normalbedingung – ausreicht, um wie beschrieben den Massenfluß (Abtransport des Mediums zur Konzentrier-Säule / Abtrennung von Mikroorganismen) durchzuführen.

21. Vorrichtung zur Durchführung des Verfahrens nach einem der Ansprüche 1–20, gekennzeichnet durch ein Gefäß (1) – ein Gas-Zellen-Reaktor, in das Gefäß (1) eingeleitete Gasgemisch (4), durch eine Leitung (5), mit Gas-Sammelraum (10) und Umleitungssteg (8), in dem Gefäß (1) enthaltene Nährmedium (3) zum Eintrag der Probe verwendete Septum-Port (2), zur homogenen Erzeugung von Gasbläschen enthaltener Strömungskörper (9), zur Trennung von Mikroorganismen vom Medium eingesetztes Filtersystem (13), zum Anschluß von Pumpen-Systemen an automatische Ventile (15, 17, 21, 22) zum Transport auf Vorkonzentriersäulen (16) oder Trenn-Säulen bzw. Kartuschen (18) und Zuführung zur Detektion nach Aufkonzentrierung und Elution als scharfe Konzentrationsbande zu einem Detektor-System (19).

22. Vorrichtung nach Anspruch 21, dadurch gekennzeichnet, daß ein Strömungskörper (Fritte) als Strömungswiderstand für gleichbleibenden Druck innerhalb des geschlossenen Systems sorgt (Reaktor-Gas-Zellenkopf/ 11) und gleichzeitig Wasser abscheidet (auch bei stoffwechselreisetzen Gasen / Fig. 4).

23. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1–22, dadurch gekennzeichnet, daß zur automatischen Dosierung mittels einer Pumpe – PC/Software kontrolliert, über Messung der H-Ionenkonzentration in der Nährlösung – über das Septum-Port (Leitung) zum Abpuffern des Mediums bei längerem Monitoring eingebracht wird.

24. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1–23, dadurch gekennzeichnet, daß die Gaszelle (Reaktor) einen optimierten Strömungskörper besitzt als geometrische Form der Kanalpore, mit einer bestimmten Phasengrenzfläche als Affinität zu wäßrigen Lösungen (Channel-Effekt, Kapillareffekt), da dieser Effekt direkt die Austauschkapazität zu umgebender Flüssigkeit beeinflusst (Definition nach Henry).

25. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1–24, dadurch gekennzeichnet, daß Säulenschaltungen mit entsprechend inerten, druckbeständigen Ventilsitzen zur Kombination unterschiedlicher Trenn-, bzw. Aufkonzentrier-Säulen und/oder zur Kombination unterschiedlicher Detektor-Systeme herangezogen werden.

26. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1–25, dadurch gekennzeichnet, daß ein Massen-Fluß-Detektor (Fig. 3) als Einzel- oder Tandem-Detektor eingesetzt wird.

27. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1–26, dadurch gekennzeichnet, daß die Gaszufuhr in die Reaktorzelle steuerbar ist (Volumenstrom/Zeiteinheit), auch gepulst werden kann oder aber erwärmt bzw. abgekühlt werden kann um im Bedarfsfall in der Reaktorzelle (1) Temperaturgradienten zu fahren.

28. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1–27,

dadurch gekennzeichnet, daß ein konstanter Partialdruck von Gas auch gelöst in einem wäßrigen Medium in der Reaktorzelle (1), aufrechterhalten wird durch Filtermembranen als Strömungsausgang (13) zu der Säulenschaltung im Hochanreicherungsprozeß und geeignetes Membran-Material beim Gasausgang (Fritte Fig. 1 u. 4/Detail 11). 5

29. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1—28, dadurch gekennzeichnet, daß die Reaktorzelle durch automatische, ansteuerbare Ventile (Fig. 7) oder manuell bedienbare, gasdichte Hähne geschlossen sind, um von Beginn an, ein steriles, geschlossenes System vorliegen zu haben. 10

30. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1—29, dadurch gekennzeichnet, daß die Reaktorzelle aus verschiedenen Materialien bestehen kann: wie Glas oder diverse Kunststoffe die autoklavierbar sind, um ggf. ein Disposable (Fertigzelle mit Medium steril befüllt) einzusetzen. 15

31. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1—30, dadurch gekennzeichnet, daß eine zusätzliche Gas-Reaktions-Mischzelle (Fig. 4/ Detail 32) an der Gaszelle (1) angebracht wurde in dem sich Laugen, Säuren oder Salzlösungen befinden, die mit den gasförmigen Stoffwechselprodukten der Mikroorganismen, reagieren. 20

32. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1—31, dadurch gekennzeichnet, daß eine Pumpe zum Transport von Gas in die Zelle vorgeschaltet oder nachgeschaltet wird (Saugen). 25 30

Hierzu 6 Seite(n) Zeichnungen

35

40

45

50

55

60

65

- Leerseite -

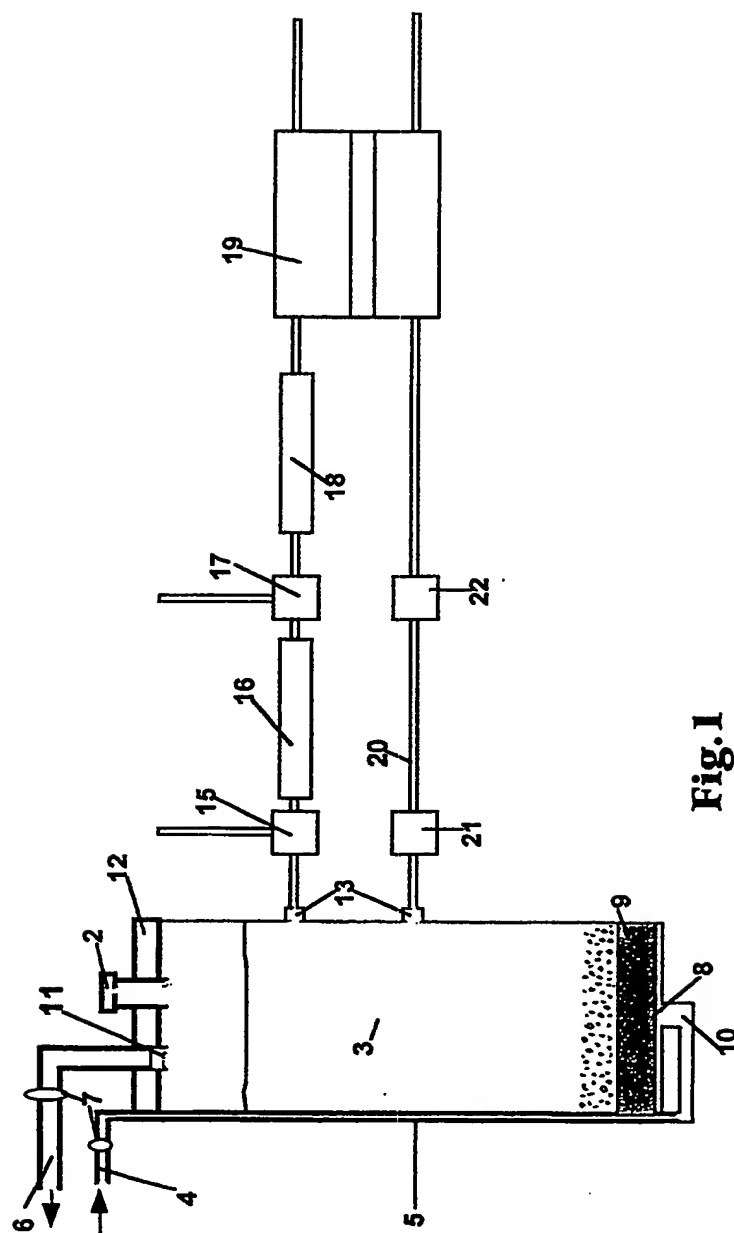
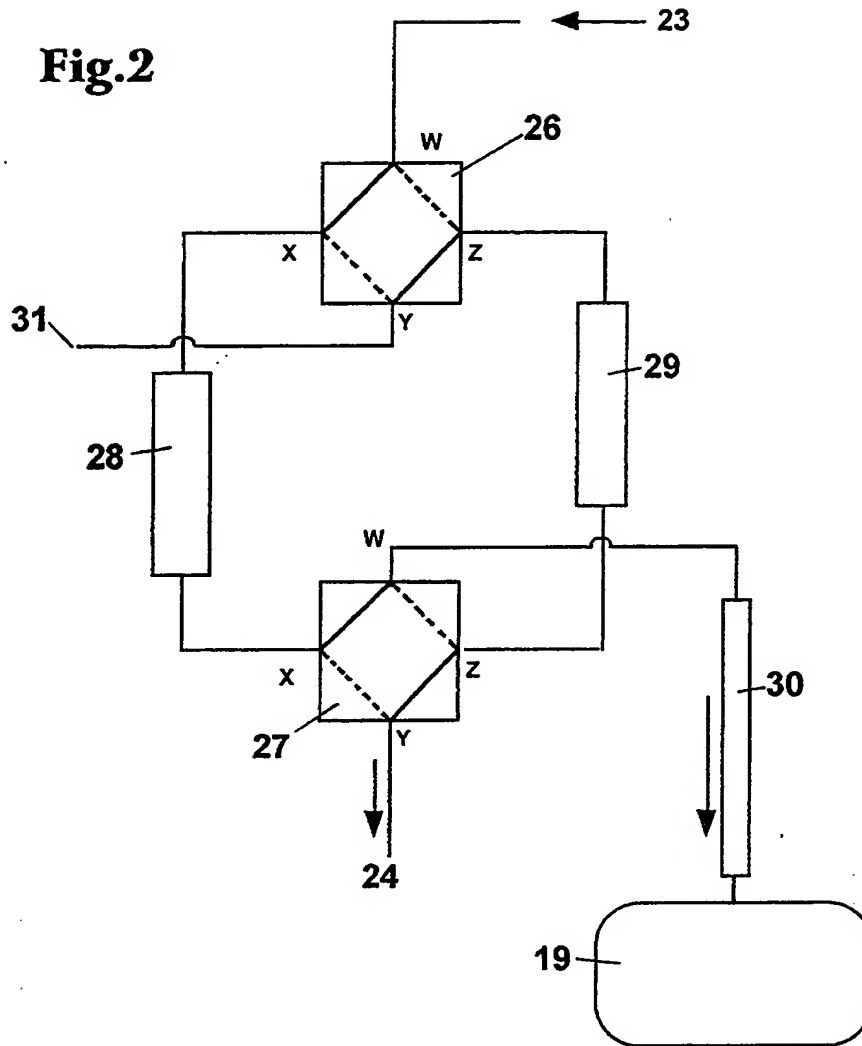
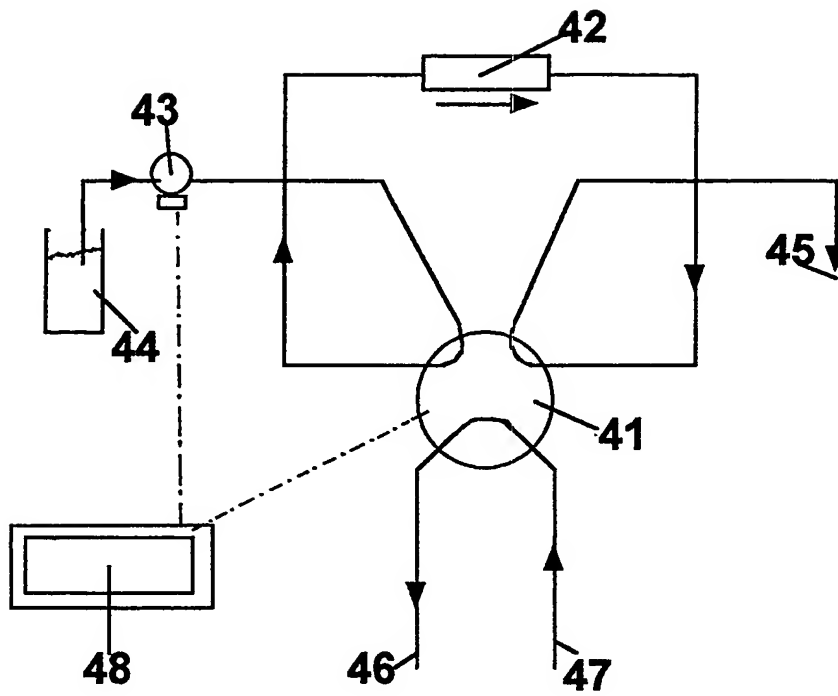


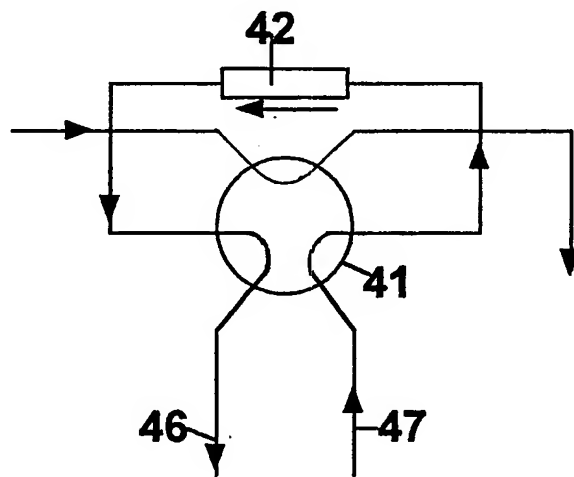
Fig. 1

Fig.2





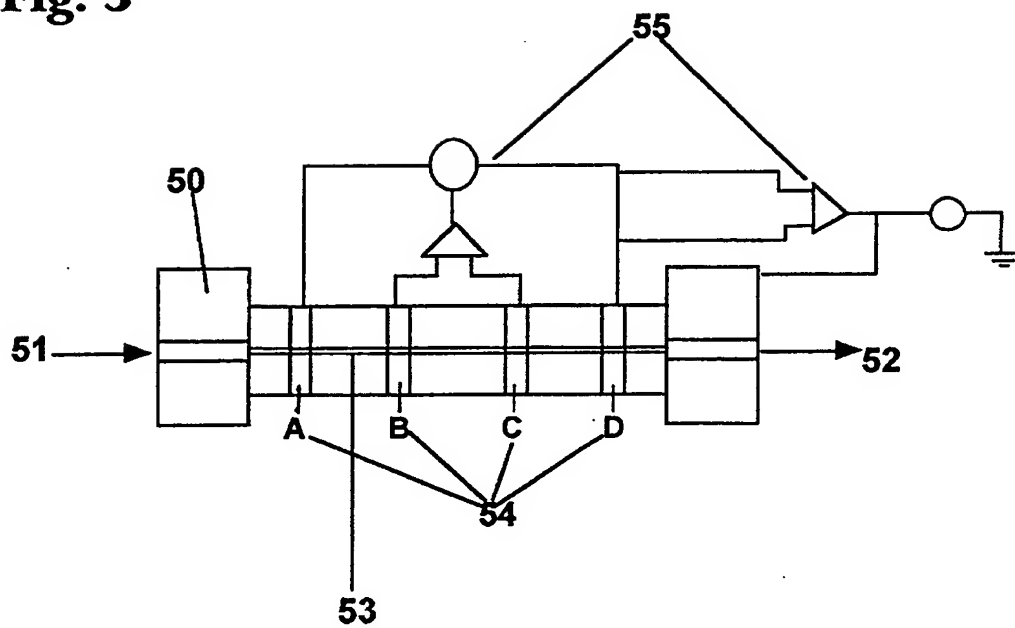
Detail A



Detail B

Fig 2 / 1

Fig. 3



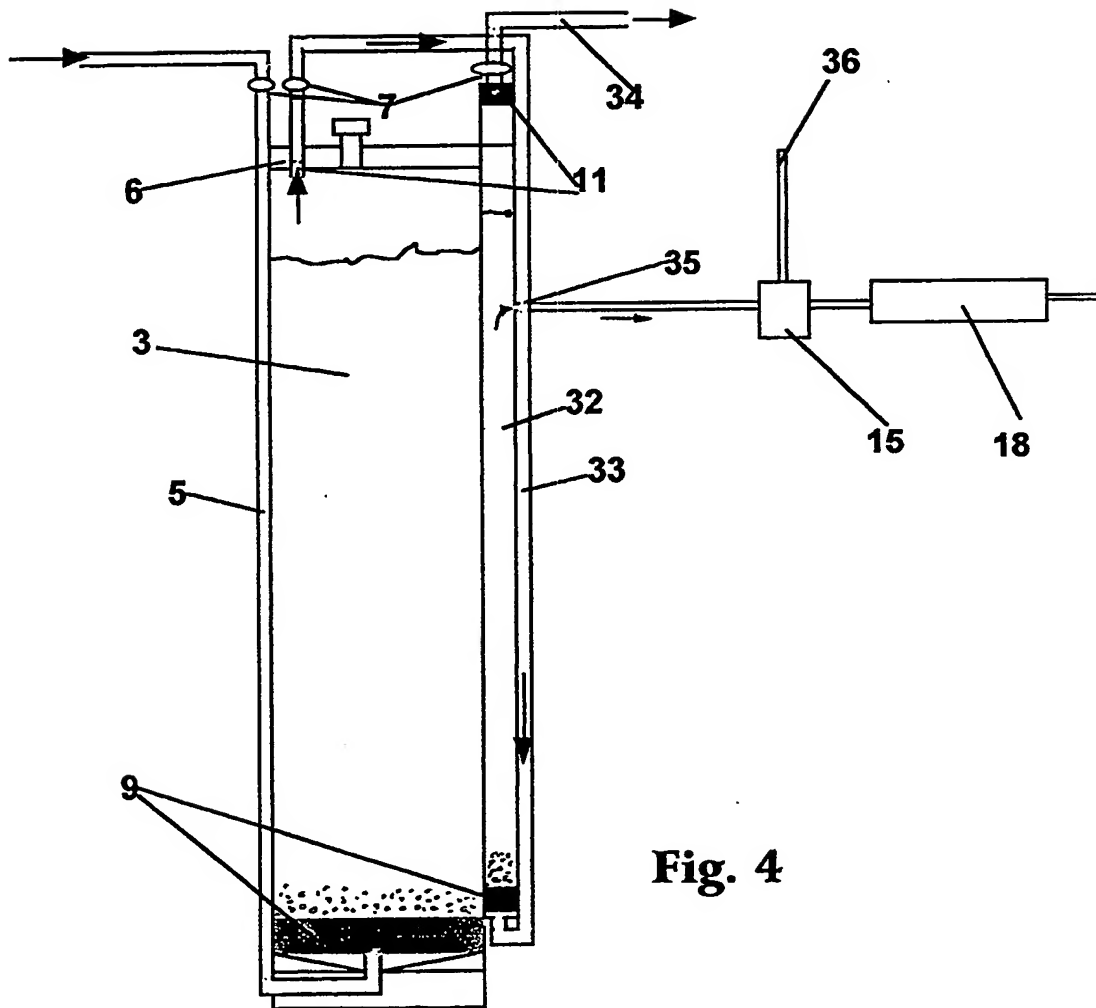


Fig. 4

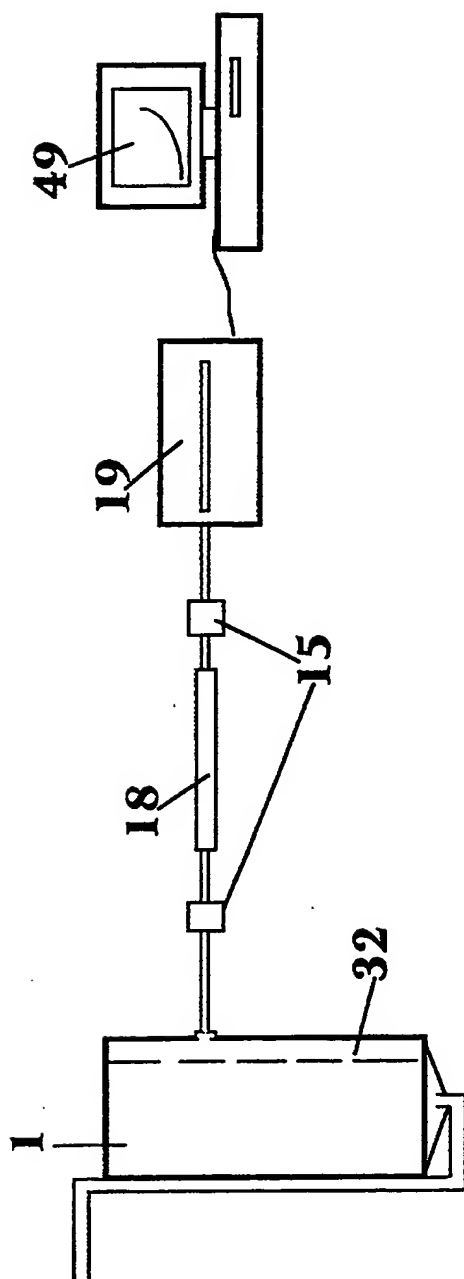


Fig. 5